

UBIANA DE CÁSSIA SILVA

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MUTANTES DE *Aspergillus niger*
EFICIENTES EM SOLUBILIZAR FOSFATO NA PRESENÇA DE
FLUORETO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2013**

T

S586s
2013

Silva, Ubiana de Cássia, 1988-

Seleção e caracterização de mutantes de *Aspergillus niger* eficientes em solubilizar fosfato na presença de fluoreto / Ubiana de Cássia Silva. – Viçosa, MG, 2013.

xii, 42f. : il. ; 29 cm.

Texto em português e inglês.

Orientador: Maurício Dutra Costa.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Aspergillus niger*. 2. Solubilização. 3. Mutagênese.
4. Fluoretos. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 579.5657

UBIANA DE CÁSSIA SILVA

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MUTANTES DE *Aspergillus niger*
EFICIENTES EM SOLUBILIZAR FOSFATO NA PRESENÇA DE
FLUORETO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 30 de agosto de 2013.

Arnaldo Chaer Borges

Leonardus Vergutz

Ivo Ribeiro da Silva
(Coorientador)

Marcos Rogério Tótola
(Coorientador)

Maurício Dutra Costa
(Orientador)

Aos meus pais.
Às minhas irmãs.
Aos grandes amigos.
A toda minha família.
Ao meu amor.

“Até os adolescentes podem esgotar-se, e jovens robustos podem cambalear, mas aqueles que confiam no Senhor renovam suas forças; ele dá-lhes asas de águia. Correm sem se cansar, vão para frente sem se fatigar.” Isaías: 40, 30-31.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua presença fiel, especialmente nos momentos mais difíceis, e por ser minha esperança e proteção em todas as circunstâncias.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia Agrícola, pela valiosa oportunidade de aprendizado.

À CAPES, pelo apoio financeiro durante o curso.

Ao professor Maurício Dutra Costa, meu orientador, pela oportunidade de trabalho, pela confiança depositada e pela sua indispensável orientação.

Aos professores, José Ivo Ribeiro e Marcos Rogério Tótola, pela coorientação neste trabalho.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia Agrícola, pelos ensinamentos durante as aulas e em todos os momentos solicitados.

Ao Gilberto Mendes, pela enorme contribuição para o êxito desta pesquisa, especialmente, pela descoberta do potencial inibitório do F e pela intensa dedicação durante a quantificação dos ácidos orgânicos.

Às estagiárias, Nina Morena, Josiane e Thalita, que me ajudaram durante o desenvolvimento deste trabalho, pela dedicação e pela disponibilidade em todos os momentos.

A todos os colegas do laboratório de Associações Micorrízicas, pela ótima convivência, por se tornarem meus amigos e por estarem sempre dispostos a ajudar.

À Cíntia, pelo imprescindível auxílio durante a montagem dos experimentos e pela amizade.

Aos companheiros de mestrado, em especial à Merielle Angélica, à Kamila Tomoko, à Lívia Gonzaga e à Maria Roméria, pelo apoio em todas as horas, pelos bons momentos que compartilhamos e por se tornarem minhas grandes amigas.

Aos colegas dos outros laboratórios do Departamento de Microbiologia, pela amizade e pela disponibilidade em ajudar.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, por todo apoio durante a pesquisa e pela boa convivência.

Aos técnicos do Núcleo de Biomoléculas, em especial à Nívea, pela intensa dedicação durante as análises dos ácidos orgânicos.

Ao professor Humberto Josué de Oliveira Ramos, pela valiosa ajuda durante as análises dos ácidos orgânicos.

Ao professor Hilário C. Mantovani, pela ajuda na análise do ácido oxálico.

Aos amigos e professores do curso de Ciências Biológicas de Sete Lagoas e da Embrapa Milho e Sorgo, pelo incentivo inicial à pesquisa.

Aos meus pais, Urbano e Arlita, pelos ensinamentos, pela compreensão, pela constante dedicação e pelo carinho, mesmo à distância.

Às minhas irmãs, Arihana e Uliana, por serem motivos de força para eu não desistir nas dificuldades, e à Thaís, pela boa convivência e pela alegria de ser titia.

Ao Chateau, pelo companheirismo, pela dedicação, pelo incentivo e pela presença; por todo amor demonstrado durante esses anos.

A toda minha grande família, em especial, aos meus tios, João Borges (*in memoriam*) e a Sirlei Serafim Borges, pelo apoio imprescindível desde os primeiros momentos de estudo, pelo carinho e pelo incentivo.

Às amigas da república As Extraordinárias e às amigas da minha segunda república, Ruth, Juliana e Poliana, por terem sido amáveis e prestativas em todos os momentos.

Aos amigos do Acampamento Maanain, por fazerem parte do meu crescimento na fé, e ao MUR, pela oportunidade de encontrar com o Senhor nos momentos de oração.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a finalização deste trabalho, seja com atitude ou com palavras de incentivo.

BIOGRAFIA

UBIANA DE CÁSSIA SILVA, filha de Urbano de Cássia Silva e Arlita Cardoso Neves Silva, nasceu no dia 26 de agosto de 1988, em Bocaiúva, Minas Gerais. Graduiu-se em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário de Sete Lagoas-UNIFEMM em 2010. No ano de 2011, iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

CONTEÚDO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	3
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12
ARTICLE: SCREENING AND CHARACTERIZATION OF <i>Aspergillus niger</i> MUTANTS EFFICIENT AT PHOSPHATE SOLUBILIZATION IN THE PRESENCE OF FLUORIDE.....	18
ABSTRACT.....	19
INTRODUCTION.....	20
MATERIALS AND METHODS	22
Microorganism and cultivation conditions	22
Mutagenesis of <i>A. niger</i>	22
Screening of mutants for P solubilization in the presence of fluoride.....	23
Characterization of <i>A. niger</i> mutants.....	23
Effect of fluoride on RP solubilization by <i>A. niger</i> mutants	24
P-solubilizing performance of <i>A. niger</i> mutants with different P sources	24
Analytical methods.....	24
Statistical analyses.....	25

RESULTS	26
Mutagenesis of <i>A. niger</i>	26
Characterization of <i>A. niger</i> mutants.....	26
Effect of fluoride on RP solubilization by <i>A. niger</i> mutants	27
P-solubilizing performance of <i>A. niger</i> mutants with different P sources	28
DISCUSSION	28
ACKNOWLEDGEMENTS	31
REFERENCES.....	32

RESUMO

SILVA, Ubiana de Cássia, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2013. **Seleção e caracterização de mutantes de *Aspergillus niger* eficientes em solubilizar fosfato na presença de fluoreto.** Orientador: Maurício Dutra Costa. Coorientadores: Ivo Ribeiro da Silva e Marcos Rogério Tótola.

O uso dos micro-organismos solubilizadores de fosfato (P) é uma alternativa para o uso sustentável do P tendo em vista a diminuição das reservas fosfáticas de alta qualidade. As características químicas dos fosfatos de rocha (FR), em especial o nível de elementos tóxicos, podem influenciar a eficiência de solubilização microbiana. O fluoreto (F⁻) liberado de fluorapatitas inibi significativamente o processo de solubilização por *Aspergillus niger* FS1. Assim, o objetivo deste estudo foi selecionar mutantes de *A. niger* eficientes na solubilização de fosfato na presença de F⁻. Três mutantes selecionados foram também caracterizados quanto aos mecanismos de solubilização de fosfato e ao potencial de solubilização de diferentes fontes de P. Vinte e nove mutantes com alterações na solubilização de fosfato foram obtidos. O mutante FS1-331 demonstrou maior potencial de solubilização de fosfato de Araxá, enquanto que o mutante FS1-555 aumentou o P solubilizado em meio de cultura com fosfato de cálcio suplementado com F⁻ e naqueles com fontes sintéticas de P. Os mutantes avaliados mostraram maior tolerância ao F⁻ do que o tipo selvagem e tiveram a produção de ácidos orgânicos alterada. A maior produção de ácido oxálico pelos mutantes FS1-331 e FS1-555 relacionou-se com o melhor

desempenho dessas estirpes na solubilização de fosfato de Araxá. Um mutante com solubilização de P diminuída (FS1-375) apresentou menor produção de ácidos orgânicos quando comparado ao tipo selvagem, corroborando a importância desses compostos para o processo de solubilização de FRs. O mutante FS1-331 foi o mais eficiente na solubilização dos FRs de Araxá, Catalão e Patos de Minas. A variação na solubilização de P das estirpes fúngicas estudadas pode contribuir para a melhor compreensão do processo de solubilização de fosfatos por *A. niger*. Além disso, os mutantes mais eficientes obtidos apresentam alto potencial de aplicação em sistemas microbianos de solubilização de fosfatos com fontes de P ricas em fluoreto.

ABSTRACT

SILVA, Ubiana de Cássia, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa. August 2013. **Screening and characterization of *Aspergillus niger* mutants efficient at phosphate solubilization in the presence of fluoride.** Advisor: Maurício Dutra Costa. Co-Advisors: Ivo Ribeiro da Silva and Marcos Rogério Tótola.

The use P solubilizing microorganisms are an alternative for a sustainable use of P against a backdrop of depletion of high-grade ores. Nevertheless, the chemical characteristics of rock phosphates (RP), particularly the level of toxic elements, can affect the efficiency of microbial solubilization. Fluoride (F^-) released from fluorapatites has been shown to significantly inhibit P solubilization by *Aspergillus niger*, stimulating the search for alternatives to overcome F^- toxicity. Thus, the aim of this study was to select *A. niger* mutants efficient at P solubilization in the presence of F^- . Three selected mutants were also characterized as to their P solubilization mechanisms and the solubilization potential of different P sources. Twenty-nine mutants were obtained that presented changes in their phosphate solubilization activity in comparison to the wild type (WT). The mutant FS1-331 showed higher solubilization of Araxá RP, while FS1-555 promoted higher soluble P when grown in media with calcium phosphate supplemented with F^- and in those with pure P sources. These mutants also showed higher tolerance to F^- than the WT and displayed changes in the production of organic acids. The higher production of oxalic acid by FS1-331 and FS1-555 correlated with their improved capacity of

Araxá RP solubilization. A mutant with decreased P solubilization capacity showed lower production of organic acids, corroborating the importance of these compounds for RP solubilization. FS1-331 was more efficient at solubilizing Araxá, Catalão, and Patos de Minas RPs than the WT and FS1-555. The variation in P solubilization capacity of the mutants obtained in this work may help clarify the RP solubilization mechanisms by *A. niger*. Moreover, the mutants with better performance selected in this work show potential for use in microbial RP solubilization systems with P sources rich in fluoride.

INTRODUÇÃO

Fertilizantes fosfatados são amplamente utilizados na agricultura para melhorar a fertilidade do solo, principalmente nas regiões tropicais. Devido ao aumento da demanda mundial por alimentos, algumas estimativas indicam a diminuição das reservas de fosfato de alta qualidade que são atualmente mineradas. A utilização de FR menos reativo, como os FRs de origem ígnea, em consórcio com micro-organismos solubilizadores de P (MSP) constitui alternativa para o uso sustentável desse nutriente, visto que o emprego direto dos FRs no sistema solo-planta apresenta baixa eficiência em razão da pequena solubilidade desses materiais.

O processo de solubilização microbiológica de fosfato tem sido correlacionado, principalmente, com a liberação de ácidos orgânicos pelos micro-organismos solubilizadores. Dentre as diversas espécies de fungos e bactérias capazes de realizar o processo de solubilização de P, destaca-se o *Aspergillus niger* que tem sido relatado como eficiente na disponibilização de P a partir de diferentes minerais. Essa espécie fúngica é capaz de produzir os ácidos cítrico, oxálico e glucônico, comumente associados ao processo de solubilização de FRs.

A capacidade de solubilização de fosfato pelos micro-organismos é influenciada pela composição química do FR. Frequentemente, esse material pode conter elementos tóxicos que comprometem o desenvolvimento de micro-organismos e, conseqüentemente, o potencial de solubilização. Recentemente, verificou-se que, para o fosfato de Araxá, o teor de F^- liberado durante o processo de solubilização por *A. niger* FS1 é responsável por significativa redução do potencial de solubilização de fosfatos por esse fungo. Uma das principais formas de atuação do F^- no metabolismo microbiano dá-se por meio da inibição de enzimas importantes para o funcionamento

celular. Além disso, o F^- pode interferir negativamente na modulação da expressão gênica, no ciclo, na proliferação e na migração celulares, na respiração, no metabolismo, no transporte de íons, na secreção, na endocitose, na apoptose e no estresse oxidativo.

Algumas estratégias podem ser utilizadas visando-se eliminar ou reduzir os efeitos inibitórios do F^- sobre a solubilização microbiana de FR: o emprego de sistemas de fermentação em que apenas os metabólitos microbianos sejam adicionados ao FR de forma que não ocorra o cultivo direto do micro-organismo solubilizador na presença do mineral; a remoção do F^- presente no FR com vistas a mitigar os efeitos inibitórios pela redução da concentração ou eliminação do elemento do meio; o isolamento de estirpes naturalmente tolerantes ao F^- a partir de amostras ambientais; e, finalmente, a obtenção de mutantes de micro-organismos solubilizadores com alto potencial de solubilização e mais tolerantes ao F^- .

Mutações ocasionadas pela exposição à luz UV podem ser utilizadas para acelerar o processo evolutivo de fungos mediante a introdução de variabilidade genética. A luz UV tem sido empregada amplamente em razão da eficiência e do baixo custo e por oferecer menor risco à saúde durante a manipulação quando comparada com outros agentes mutagênicos químicos e físicos. Mutantes de micro-organismos solubilizadores de fosfato com maior potencial de solubilização já foram obtidos utilizando-se a luz UV. A título de exemplo, um mutante de *Penicillium rugulosum* produzido por mutagênese com UV apresentou maior halo de solubilização de hidroxapatita e $FePO_4$ do que a estirpe selvagem e demonstrou alto desempenho na solubilização de diferentes tipos de fosfatos de rocha. Da mesma forma, mutantes de *Aspergillus tubingensis* com maior ou menor potencial de solubilização de fosfato já foram obtidos, corroborando com a eficiência da técnica em gerar variabilidade.

Tendo em vista os efeitos inibitórios do F^- sobre o crescimento fúngico, a produção de ácidos orgânicos e a solubilização microbiana de fosfato, o objetivo deste trabalho foi à seleção e caracterização de mutantes de *A. niger* mais eficientes em solubilizar fosfato tricálcico na presença de F^- visando à utilização em sistemas de solubilização microbiana de fluorapatitas.

REVISÃO DE LITERATURA

O P é requerido por todos os organismos, sendo essencial ao funcionamento celular. Participa da composição de ácidos nucleicos, de fosfolipídeos e das moléculas responsáveis pela transferência de energia na célula, a exemplo do ATP. Na agricultura, é essencial para o crescimento das plantas, sendo um dos principais nutrientes limitantes ao rendimento das culturas.

As fontes de P são constituídas, principalmente, por apatitas. Esses minerais podem ser de origem ígnea, sedimentar ou de acumulação orgânica. As variedades mais comuns de apatita são a fluorapatita $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{F})]$, a hidroxiapatita $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})]$ e, mais raramente, a cloroapatita $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{Cl})]$ (Toledo & Pereira 2001). A maioria das rochas fosfáticas estão distribuídas em cinco países: Marrocos, China, Estados Unidos, África do Sul e Jordânia. O Marrocos possui em torno de 80% do total das reservas fosfáticas e os cinco países reunidos controlam 90% das reservas mundiais de P (Jasinski 2011). As reservas de P podem ser consideradas como recurso finito (Cordell & White 2011). Além disso, a diminuição das fontes de P de alta qualidade que são mineradas atualmente, projetadas para o futuro, poderá gerar tensões geopolíticas consideráveis, haja vista que poucos países são detentores desse recurso.

A demanda mundial por P é crescente. Apesar da necessidade de P da Europa e da América do Norte ser considerada estável, nos países em desenvolvimento o uso desse elemento tem aumentado. Esse fato contribuirá para o aumento, no curto prazo, da dependência desses países pela importação de P (Neset et al., 2008). No Brasil,

por exemplo, a dependência das importações de P está na ordem de 50 % do total de fertilizantes fosfatados utilizados atualmente (ANDA, 2013).

Existe grande interesse no uso sustentável de P, tanto pelo aumento da eficiência de utilização quanto por meio de sua reciclagem a partir de resíduos orgânicos (Gilbert 2009, Cordell et al., 2011, Vassilev et al., 2013b). Almeja-se, também, o uso mais racional de fertilizantes fosfatados, haja vista os gastos em combustíveis fósseis necessários ao processamento e transporte desses produtos (Cordell & White 2011).

A exploração das reservas de P de menor qualidade representa estratégia relevante para a sustentabilidade no uso desse elemento. No Brasil, as reservas de fosfatos são constituídas, em sua maioria, por rochas menos reativas, de origem ígnea. Essas rochas estão associadas a complexos carbonatíticos, sendo que 67% estão no estado de Minas Gerais, 14 % em Goiás e 6% em São Paulo. Os outros 13% estão nos estados de Santa Catarina, Ceará, Pernambuco, Bahia, Paraíba, Tocantins, Maranhão, Piauí e Mato Grosso do Sul (Souza & Fonseca 2009). Alguns trabalhos já foram realizados utilizando fosfatos de rocha (FR) de baixa reatividade (Bedin et al., 2003, Steiner et al., 2009, Chaves et al., 2013), com indicações de que o uso dessas fontes poderá ser vantajoso considerando os custos, a disponibilidade e o efeito residual desses materiais, além da perspectiva de redução da dependência nacional pela importação de fertilizantes fosfatados. Todavia, o emprego direto desses fosfatos na fertilização do solo ainda não é economicamente recomendável (Simpson et al., 1998), visto que a liberação de P é muito lenta, se comparada aos fertilizantes convencionais (Lopes et al., 2004). Uma alternativa para aumentar a disponibilização de P presente nos FRs de menor qualidade é o uso de micro-organismos solubilizadores de fosfato, MSF (Vassilev et al., 2007, Farhat et al., 2009, Oliveira 2011, Mendes et al., 2013c, Mendes et al., 2013b, Mendes et al., 2013a).

Bactérias e fungos são capazes de solubilizar fosfato, participando do ciclo biogeoquímico desse elemento (Richardson & Simpson 2011). Dentre as bactérias solubilizadoras de P, destacam-se os gêneros *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter*, *Erwinia* e *Flavobacterium* (Rodríguez & Fraga 1999). Dentre os fungos, os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* compreendem aqueles de maior potencial de solubilização de fosfato relatados na literatura (Silva Filho et al., 2002, Mittal et al., 2008). Em geral, os

fungos apresentam maior capacidade de solubilização de fosfato em razão do elevado potencial de geração de acidez e à maior tolerância a condições ácidas, quando comparados com bactérias (Silva Filho & Vidor 2000).

Os mecanismos responsáveis pela solubilização microbiológica de P ainda não estão totalmente esclarecidos. De modo geral, acredita-se que a capacidade dos MSF de liberar o P numa forma solúvel está associada à liberação de ácidos orgânicos durante o processo de solubilização (Mendes et al., 2013b). Os fatores que desencadeiam a disponibilização de P por MSF não estão relacionados apenas à produção dos ácidos orgânicos, mas, também, à liberação de íons H^+ durante a assimilação de NH_4^+ ou através de outras reações metabólicas que desencadeiam a excreção de prótons, como a respiração (Illmer & Schinner 1995). Além disso, compostos desconhecidos apresentando massa molecular maior do que 500 Da já foram relatados como atuantes no processo (Young et al., 2000). Geralmente, o abaixamento do pH correlaciona-se com o aumento dos níveis de P solubilizado (Reyes et al., 1999a, Khan et al., 2009, Oliveira 2011, Mendes et al., 2013b), o que sustenta a hipótese de que a liberação de íons H^+ tem papel importante na solubilização, assim como a produção de ácidos orgânicos.

Vários ácidos orgânicos estão envolvidos com o processo de solubilização de fosfato efetuado por MSF. Por exemplo, os ácidos cítrico, oxálico e glucônico são os mais descritos durante a disponibilização de P mediada por fungos filamentosos e os ácidos láctico e itacônico destacam-se, também, no processo de solubilização de fosfato exercido por *Rhizopus oryzae* e *Aspergillus terreus*, respectivamente (Vassilev et al., 2013a). A eficiência dos ácidos orgânicos na solubilização de fosfato está relacionada à capacidade de acidificação do meio, à formação de complexos e à quelação de íons (Vassilev et al., 2013a). Os grupos hidroxila e carboxila dos ácidos orgânicos ligam-se aos cátions na estrutura do fosfato, liberando o P em forma solúvel (Sagoe et al., 1998). Além disso, a produção de ácidos orgânicos confere vantagens competitivas ao micro-organismo. Em meio com alto teor de Al e Fe, os ácidos orgânicos formam complexos organo-metálicos, que podem diminuir a toxicidade desses elementos (Jarosz-Wilkolazka & Gadd 2003). Também, esses compostos promovem a quelação de íons metálicos formando cristais insolúveis, retirando elementos tóxicos da solução (Magnuson & Lasure 2004).

O ácido cítrico é um dos principais agentes químicos no processo de solubilização de fosfato (Mendes et al., 2013b). O ácido cítrico é um ácido tricarbóxico sintetizado nas vias metabólicas centrais, particularmente, pela atividade da enzima citrato sintase no ciclo de Krebs. Esse ácido também pode ser produzido por uma via metabólica alternativa mediante a atividade da enzima piruvato carboxilase. O funcionamento concomitante do ciclo de Krebs e da via alternativa de produção de ácido cítrico com atuação da piruvato carboxilase confere ao micro-organismo alta eficiência na conversão de carbono nesse metabólito (Magnuson & Lasure 2004). A capacidade desse ácido de liberar P a partir de fontes pouco solúveis ocorre em razão do poder de quelação e de liberação de prótons desse composto (Kpoblekou-A & Tabatabai 1994).

O ácido oxálico possui alta capacidade de formação de complexos, especialmente com o cálcio, cuja remoção favorece a solubilização de fosfato pela mudança do ponto de saturação do meio (Schneider et al., 2010). A liberação de ácido oxálico por *Pseudomonas fluorescens* levou à solubilização de fosfato tricálcico e de vários tipos de FR (Vyas & Gulati 2009). O ácido oxálico, dicarbóxico, é sintetizado pela enzima oxaloacetato hidrolase (OAH) por meio da quebra do oxaloacetato em oxalato e acetato. O oxaloacetato pode ser formado no ciclo de Krebs ou no citoplasma pela ação da piruvato carboxilase (Kubicek et al., 1988). Além do oxaloacetato, o oxalosuccinato também pode ser precursor do ácido oxálico (Bomstein & Johnson 1952). Nessa via, o oxalato é sintetizado na via do glioxilato pela atuação da glioxilato desidrogenase (Munir et al., 2001). O ácido oxálico pode ser produzido por vasta gama de fungos, a exemplo dos fungos causadores das podridões branca e marrom, dos fungos ectomicorrízicos e de alguns fungos fitopatogênicos (Magnuson & Lasure 2004, Gonzalez et al., 2009)

O ácido glucônico promove a dissolução de fosfatos por meio da acidificação do meio e da quelação (Magnuson & Lasure 2004). Esse composto constitui-se de ácido monocarbóxico sintetizado extracelularmente pela enzima glicose oxidase. Essa enzima catalisa a reação de oxidação da glicose para glucono- δ -lactona e a redução concomitante do oxigênio molecular para peróxido de hidrogênio (Frederick et al., 1990). Num segundo passo, glucono- δ -lactona é hidrolisada por processo não enzimático a ácido glucônico e a coenzima FADH₂ é reoxidada pelo O₂ (Khattab & Bazaraa 2005). De modo geral, micro-organismos com elevada capacidade de

solubilização de fontes puras de fosfato de cálcio apresentam produção de ácido glucônico nos sistemas de solubilização (Lin et al., 2006, Chuang et al., 2007, Mendes et al., 2013b).

A produção de ácidos orgânicos sofre influência das condições do meio. A fonte de carbono e de nitrogênio, o teor de P e a presença de metais são algumas das variáveis que interferem na síntese desses compostos. A produção do ácido cítrico, por exemplo, é estimulada em condições limitantes de nitrogênio e o cultivo de alguns fungos na presença de nitrato estimula a produção de ácidos orgânicos em comparação ao cultivo realizado na presença de amônio (Cunningham & Kuiack 1992, Whitelaw et al., 1999). Todavia, ainda não é bem compreendido o efeito da fonte de nitrogênio sobre a produção dos ácidos orgânicos (Plassard & Fransson 2009). Várias fontes de carbono já foram usadas como substrato para processos de fermentação visando à produção de ácidos orgânicos, incluindo hexoses, pentoses, n-alkanos, glicerol, além de materiais complexos (Vassilev et al., 2013a). O bagaço de cana é uma das fontes de carbono complexas utilizadas nos sistemas de fermentação em estado sólido com vistas à solubilização de fosfatos. Essa fonte de carbono é promissora para a produção de ácidos orgânicos pelo fungo *A. niger* no processo de solubilização de FR (Mendes et al., 2013c).

A concentração de P e a presença de metais são também fatores importantes para a síntese dos ácidos orgânicos por micro-organismos (Gadd 1999). Altas doses de P promovem maior produção de biomassa e menor síntese de ácidos (Oliveira 2011). Esse fato já foi observado, principalmente, para a produção de ácido cítrico (Papagianni 2007). Ressalta-se, no entanto, que a produção de ácidos orgânicos por micro-organismos depende da interação de muitos fatores, tais como a espécie microbiana, as fontes de carbono e de nitrogênio e do método de cultivo. A presença de Zn, Mn, Fe, Cu, metais pesados e metais alcalinos no meio inibe a produção de ácido cítrico (Gadd 1999, Papagianni 2007). Já a síntese de ácido oxálico é estimulada por Mn (Plassard & Fransson 2009) O efeito dos metais depende dos níveis de pH, sendo que em pH básico, ocorre a formação e precipitação de óxidos ou hidróxidos metálicos e, em pH ácido, a concentração de íons metálicos em solução aumenta, levando à competição com H^+ por sítios de adsorção na célula (Gadd 1999, Sayer & Gadd 2001).

A composição química dos FRs também exerce influencia sobre a produção de ácidos orgânicos e, conseqüentemente, sobre a solubilização de FR. Os FRs, geralmente, apresentam elementos tóxicos que exercem efeito inibitório ao metabolismo microbiano (Banik & Dey 1982, Mendes et al., 2013a). Os elementos liberados durante o processo de solubilização de FR podem interferir também no crescimento do micro-organismo e, conseqüentemente, na disponibilização de P (Mendes et al., 2013a). O teor de Zn, por exemplo, exerce efeito inibitório sobre a solubilização de fosfatos em razão da interferência negativa na aquisição de K^+ , no efluxo de H^+ e no crescimento fúngico. O cálcio é elemento importante no meio intracelular, atuando como mensageiro secundário durante o crescimento e a diferenciação de fungos. No entanto, em altas concentrações, pode se tornar tóxico à célula causando a precipitação de fosfatos, o que inibe todo o desenvolvimento celular (Gadd 1993). Os compostos tóxicos podem afetar ainda processos genéticos, físico-químicos e bioquímicos dos micro-organismos. A resposta à toxicidade causada por esses compostos pode variar entre estirpes, estágio de crescimento e entre as formas vegetativas e reprodutivas dos micro-organismos (Sabie & Gadd 1990, Gadd 1993). Recentemente, verificou-se que dentre os elementos que afetam negativamente o processo de solubilização microbiana dos FRs, o fluoreto (F^-) é o mais importante (Mendes et al., 2013a). Para o fosfato de Araxá, demonstrou-se que o F^- reduz em até 55% o nível de P solubilizado ao final do processo (Mendes et al., 2013a).

O F^- pode interferir em inúmeros processos nas células microbianas, como na modulação da expressão gênica, no ciclo celular, na proliferação e na migração celulares, na respiração, no metabolismo, no transporte de íons, na secreção, na endocitose, na apoptose e no estresse oxidativo (Barbier et al., 2010). Além disso, concentrações em torno de um milimolar reduzem significativamente o crescimento fúngico e a produção de ácido cítrico na ordem de 47 e 85,5%, respectivamente (Agrawal et al., 1983). Uma das principais formas de atuação do F^- é pela inibição enzimática (Adamek et al., 2005). A inibição da enolase, enzima da via glicolítica, é um exemplo de atuação do F^- que pode ocorrer mesmo em concentrações micromolares do elemento (Belli et al., 1995). Em seu estado iônico ou como HF, promove a inibição direta de enzimas que apresentam grupo heme ou metaloenzimas. Na forma de complexos metálicos, com alumínio ou berílio, pode exercer a inibição

das enzimas pela competição por sítios de ligação de P (Marquis et al., 2003). O F^- é capaz de interagir, ainda, com sistemas enzimáticos que atuam na transferência de grupamento fosforil, como GTPases e ATPases (Barbier et al., 2010) e ocasionar efeitos adversos no metabolismo celular.

Os efeitos do F^- ou de outros compostos inibitórios para as células microbianas podem ser minimizados desde que o micro-organismo desenvolva mecanismos de tolerância a esses elementos, a saber, a precipitação extracelular, a complexação, a cristalização, a transformação por meio de reações de oxidação, redução, metilação e desalquilação, a biossorção a paredes celulares, pigmentos e polissacarídeos extracelulares, a diminuição do transporte ou impermeabilidade, o efluxo, a compartimentação intracelular, a precipitação e, ou sequestro (Ross 1975, Gadd & Griffiths 1977, Mehra & Winge 1991).

Algumas estratégias podem ser desenvolvidas para contornar o efeito inibitório do F^- sobre o potencial microbiano de solubilização de fosfato: sistemas de fermentação em que apenas os metabólitos microbianos sejam adicionados ao FR, de forma que não ocorra o cultivo direto dos micro-organismos na presença do FR (Goldstein et al., 1993); a remoção do F^- liberado durante a solubilização do FR; o isolamento de estirpes naturalmente tolerantes ao F^- a partir de amostras ambientais; obtenção de mutantes mais tolerantes ao F^- a partir de MSF com alto potencial de solubilização.

A mutagênese induzida é bastante utilizada para o melhoramento genético de micro-organismos, podendo torná-los mais resistentes a compostos inibitórios. As mutações podem ser alcançadas por diferentes mecanismos: mediante o uso de agentes mutagênicos físicos e químicos, que induzem a mutação aleatoriamente, ou pela manipulação do ciclo sexual e parassexual, para obtenção de recombinantes. Outra forma de desenvolver estirpes mutantes é através do uso de técnicas de engenharia genética que permitam tanto a introdução de novos materiais no genoma como a deleção de regiões gênicas de interesse (Nevalainen 2001). Contudo, a manipulação genética adequada para determinado organismo muitas vezes representa grande desafio. No caso dos fungos filamentosos, por exemplo, o desenvolvimento de método de transformação pode não ser trivial, a depender do fungo utilizado, visto que em muitos casos os eventos de integração ilegítima podem ocorrer com alta frequência (Meyer 2008).

A luz ultra violeta (UV), dentre os agentes físicos, é frequentemente usada para a obtenção micro-organismos mutantes (Reyes et al., 1999b, Hao et al., 2006, Maresma et al., 2010). A irradiação com a luz UV pode induzir a formação de vários tipos de lesões no DNA. Os danos mais frequentes são a formação dos dímeros de pirimidina ciclobutano e os fotoprodutos (6-4) pirimidina-pirimidona (Pfeifer et al., 2005). Ambas as lesões modificam a estrutura do DNA gerando torções que alteram a replicação e a transcrição (Clancy 2008). As lesões causadas pela UV podem ser reparadas pela atividade da enzima DNA fotoliase de forma dependente da luz visível. Essa enzima promove quebra na região atingida pela UV sem alterar a estrutura das ligações fosfodiésteres do DNA danificado. Um cromóforo converte a energia da luz visível em energia química necessária para esta reação. Além disso, o reparo por excisão de nucleotídeos também atua sobre o DNA danificado pela UV que escapa do reparo por fotorreativação (Goldman et al., 2002, Clancy 2008). Portanto, a mutação por UV ocorre mediante erros de reparo e no preenchimento das falhas no DNA da fita complementar à que possui o dímero (Azevedo 2008).

Mutações desencadeadas pela exposição à luz UV podem ser utilizadas para acelerar o processo evolutivo dos fungos mediante a introdução da variabilidade genética (Borba et al., 2007). O uso da luz UV tem sido empregado em muitos estudos dada a eficiência da técnica e o baixo custo e por oferecer menor risco à saúde durante a manipulação, quando comparada a outros agentes mutagênicos químicos e físicos (Nevalainen 2001, Azevedo 2008). Mutantes de *A. niger* com aumento da produção de ácido cítrico foram obtidos pela exposição dos esporos a diferentes doses de UV (Hamissa 1992). Da mesma forma, mutantes do fungo patogênico *Ophiostoma ulmi*, hipersensíveis a UV foram desenvolvidos mediante a atuação da luz UV (Bernier & Hubbes 1994).

Mutantes de MSF têm sido obtidos utilizando-se a luz UV como agente mutagênico (Reyes et al., 1999b, Achal et al., 2007). Um mutante de *Penicillium rugulosum*, produzido por essa técnica, apresentou maior halo de solubilização de hidroxiapatita e FePO_4 comparado à estirpe selvagem e demonstrou alto desempenho na solubilização de diferentes tipos de fosfatos de rocha (Reyes et al., 1999a, Reyes et al., 2001). Além disso, mutantes de *Aspergillus tubingensis* com aumento e diminuição do potencial de solubilização de fosfato foram desenvolvidos por Achal et al., (2007).

Dessa forma, a mutagênese por luz UV torna-se relevante para o melhoramento dos MSF tendo em vista a capacidade desse agente mutagênico em acelerar o processo evolutivo dos micro-organismos. A mutagênese dos MSF utilizando meios de cultura específicos para a seleção das características de interesse pode permitir a obtenção dos fenótipos: aumento do potencial de solubilização de P e maior tolerância ao F^- , o que contribuirá para um avanço na área de solubilização microbiológica de P, especialmente, para os FRs com alto teor de F^- .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achal V, Savant VV & Reddy MS (2007) Phosphate solubilization by a wild type strain and UV-induced mutants of *Aspergillus tubingensis*. *Soil Biol Biochem* **39**: 695-699.
- Adamek E, Pawlowska-Goral K & Bober K (2005) In vitro and in vivo effects of fluoride ions on enzyme activity. *Ann Acad Med Stetin* **51**: 69-85.
- Agrawal PK, Bhatt CS & Viswanathan L (1983) Effect of some metabolic inhibitors on citric acid production by *Aspergillus niger*. *Enzyme Microb Tech* **5**: 373-376.
- Azevedo JL (2008) *Genética de microorganismos*. UFG, Goiânia.
- Banik S & Dey BK (1982) Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing micro-organisms. *Plant Soil* **69**: 353-364.
- Barbier O, Arreola-Mendoza L & Del Razo LM (2010) Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chem Biol Interact* **188**: 319-333.
- Bedin I, Furtini Neto AE, Resende AV, Faquin V, Tokura AM & Santos JZL (2003) Fertilizantes fosfatados e produção da soja em solos com diferentes capacidades tampão de fosfato. *Rev Bras Ciênc Solo* 639-646.
- Belli WA, Buckley DH & Marquis RE (1995) Weak acid effects and fluoride inhibition of glycolysis by *Streptococcus mutans* GS-5. *Can J Microbiol* **41**: 785-791.
- Bernier L & Hubbes M (1994) Induction and genetic characterization of ultraviolet-sensitive mutants in the elm tree pathogen *Ophiostoma ulmi* (sensu lato). *Mycol Res* **98**: 943-953.
- Bomstein RA & Johnson MJ (1952) The mechanism of formation of citrate and oxalate by *Aspergillus niger*. *J Biol Chem* **198**: 143-153.
- Borba RdS, Loeck AE, Branco JSC, Kopp MM & Oliveira ACd (2007) Polimorfismo do fungo simbionte de formigas cortadeiras submetido à luz ultravioleta. *Ciênc Rural* **37**: 1221-1226.
- Chaves DP, Zucareli C & Junior AdO (2013) Fontes de fósforo associadas à inoculação com *Pseudomonas fluorescens* no desenvolvimento e produtividade do milho. *Ciênc Agrar* **34**: 57-72.
- Chuang C-C, Kuo Y-L, Chao C-C & Chao W-L (2007) Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. *Biol Fertil Soils* **43**: 575-584.

Clancy S (2008) DNA damage & repair: mechanisms for maintaining DNA integrity. *Nat Educ* **1**: 1.

Cordell D & White S (2011) Peak phosphorus: Clarifying the key issues of a vigorous debate about long-term phosphorus security. *Sustain* **3**: 2027-2049.

Cordell D, Rosemarin A, Schröder JJ & Smit AL (2011) Towards global phosphorus security: A systems framework for phosphorus recovery and reuse options. *Chemosphere* **84**: 747-758.

Cunningham JE & Kuiack C (1992) Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. *Appl Environ Microbiol* **58**: 1451-1458.

Farhat BM, Bejar W, Kammoun R, Bouchaala K, Fourati A, Antoun H, Bejar S & Chouayekh H (2009) Characterization of the mineral phosphate solubilizing activity of *Serratia marcescens* CTM 50650 isolated from the phosphate mine of Gafsa. *Arch Microbiol* **191**: 815-824.

Frederick KR, Tung J, Emerick RS, Masiarz FR, Scott H. Chamberlain, Vasavada A & Rosenberg S (1990) Glucose Oxidase from *Aspergillus niger* *Journal of Biological Chemistry* **265** 3793-3802.

Gadd GM (1993) Interactions of fungus with toxic metals. *New Phytol* **124**: 25-60.

Gadd GM (1999) Fungal production of citric and oxalic acid: Importance in metal speciation, physiology and biogeochemical processes. *Adv Microb Physiol*, Vol. Volume 41 (Poole RK, ed.) pp. 47-92. Academic Press.

Gadd GM & Griffiths AJ (1977) Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microb Ecol* **4**: 303-317.

Gilbert N (2009) The disappearing nutrient. *Nature* **461**: 716-718.

Goldman GH, McGuire SL & Harris SD (2002) The DNA damage response in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* **35**: 183-195.

Goldstein AH, Rogers RD & Mead G (1993) Mining by microbe. *Nat Biotechnol* **11**: 1250-1254.

Gonzalez JAZ, Costa MD, Silva IR, Neves JCL, Barros NFD & Borges AC (2009) Acúmulo de ácido oxálico e cristais de cálcio em ectomicorrizas de eucalipto.: II-formação de cristais de oxalato de cálcio induzida por fungos ectomicorrízicos em raízes laterais finas. *Rev Bras Ciênc Solo* **33**: 555-562.

Hamissa FAE-A, M.S., Abdu, A., Gad, A.S. (1992) Raising potent UV mutants of *Aspergillus niger* van Tieghem for citric acid production from beet molasses *Bioresource Technol* **39**: 209-213.

Hao X-C, Yu X-B & Yan Z-L (2006) Optimization of the medium for the production of cellulase by the mutant *Trichoderma reesei* WX-112 using response surface methodology. *Food Technol Biotech* **44**: 89-94.

Illmer P & Schinner F (1995) Solubilization of inorganic calcium phosphates—Solubilization mechanisms. *Soil Biol Biochem* **27**: 257-263.

Jarosz-Wilkolazka A & Gadd GM (2003) Oxalate production by wood-rotting fungi growing in toxic metal-amended medium. *Chemosphere* **52**: 541-547.

Jasinski SM (2011) Phosphate rock, mineral commodity summaries. U.S. *Geol Surv.*

Khan AA, Jilani G, Akhtar MS, Naqvi SMS & Rasheed M (2009) Phosphorus solubilizing bacteria: Occurrence, mechanisms and their role in crop production. *J Agric Biol Sci* **1**: 48-58.

Khattab AA & Bazaraa WA (2005) Screening, mutagenesis and protoplast fusion of *Aspergillus niger*

for the enhancement of extracellular glucose oxidase production. *J Ind Microbiol Biotechnol* **32**: 289-294.

Kpombrekou-A K & Tabatabai MA (1994) Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks. *Soil Sci* **158**: 442-453.

Kubicek CP, Schreferl-Kunar G, Wohrer W & Rohr M (1988) Evidence for a cytoplasmic pathway of oxalate biosynthesis in *Aspergillus niger*. *Appl Environ Microbiol* **54**: 633-637.

Lin T-F, Huang H-I, Shen F-T & Young C-C (2006) The protons of gluconic acid are the major factor responsible for the dissolution of tricalcium phosphate by *Burkholderia cepacia* CC-A174. *Bioresource Technol* **97**: 957-960.

Lopes AS, Silva CAP & Bastos ARR (2004) Reservas de fosfatos e produção de fertilizantes fosfatados no Brasil e no mundo. *Fósforo na agricultura brasileira*, (Yamada T & Badalla SRS, eds.), pp. 1-11. Potatos, Piracicaba.

Magnuson J & Lasure L (2004) Organic acid production by filamentous fungi. *Adv Fung Biotechnol Ind Agri Med*, (Tkacz J & Lange L, eds.), pp. 307-340.

Maresma BG, Castillo BG, Fernández RC, Silva ESd, Maiorano AE & Rodrigues MFdA (2010) Mutagenesis of *Aspergillus oryzae* IPT-301 to improve the production of β - fructofuranosidase. *Braz J Microbiol* **41**: 186-195

Marquis RE, Clock SA & Mota-Meira M (2003) Fluoride and organic weak acids as modulators of microbial physiology. *FEMS Microbiol Rev* **26**: 493-510.

Mehra RK & Winge DR (1991) Metal ion resistance in fungi: molecular mechanisms and their regulated expression. *J Cell Biochem* **45**: 30-40.

Mendes GO, Vassilev NB, Bonduki VHA, da Silva IR, Ribeiro JI & Costa MD (2013a) Inhibition of *Aspergillus niger* phosphate solubilization by fluoride released from rock phosphate. *Appl Environ Microbiol* **79**: 4906-4913.

Mendes GO, Freitas ALM, Pereira OL, Silva IR, Vassilev NB & Costa MD (2013b) Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. *Ann Microbiol*.

Mendes GO, Dias C, Silva I, Júnior J, Pereira O & Costa M (2013c) Fungal rock phosphate solubilization using sugarcane bagasse. *World J Microbiol Biotechnol* **29**: 43-50.

Meyer V (2008) Genetic engineering of filamentous fungi — Progress, obstacles and future trends. *Biotechnol Adv* **26**: 177-185.

Mittal V, Singh O, Nayyar H, Kaur J & Tewari R (2008) Stimulatory effect of phosphate-solubilizing fungal strains (*Aspergillus awamori* and *Penicillium citrinum*) on the yield of chickpea (*Cicer arietinum* L. cv. GPF2). *Soil Biol Biochem* **40**: 718-727.

Munir E, Yoon J-J, Tokimatsu T, Hattori T & Shimada M (2001) New role for glyoxylate cycle enzymes in wood-rotting basidiomycetes in relation to biosynthesis of oxalic acid. *J Wood Sci* **47**: 368-373.

Neset T-SS, Bader H-P, Scheidegger R & Lohm U (2008) The flow of phosphorus in food production and consumption — Linköping, Sweden, 1870–2000. *Sci Total Environ* **396**: 111-120.

Nevalainen KMH (2001) Strain improvement in filamentous fungi-an overview. *Appl Mycol Biotech*, Vol. Volume 1 (George GK & Dilip KA, eds.), pp. 289-304. Elsevier.

Oliveira SC (2011) *Fontes de carbono e minerais na solubilização de fosfato natural não reativo por Aspergillus niger*. Universidade Federal de Viçosa.

Papagianni M (2007) Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnol Adv* **25**: 244-263.

Pfeifer GP, You YH & Besaratinia A (2005) Mutations induced by ultraviolet light. *Mutat Res* **571**: 19-31.

Plassard C & Fransson P (2009) Regulation of low-molecular weight organic acid production in fungi. *Fung Biol Rev* **23**: 30-39.

Reyes I, Bernier L, Simard RR & Antoun H (1999a) Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. *FEMS Microbiol Ecol* **28**: 281-290.

Reyes I, Baziramakenga R, Bernier L & Antoun H (2001) Solubilization of phosphate rocks and minerals by a wild-type strain and two UV-induced mutants of *Penicillium rugulosum*. *Soil Biol Biochem* **33**: 1741-1747.

Reyes I, Bernier L, Simard RR, Tanguay P & Antoun H (1999b) Characteristics of phosphate solubilization by an isolate of a tropical *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. *FEMS Microbiol Ecol* **28**: 291-295.

Richardson AE & Simpson RJ (2011) Soil microorganisms mediating phosphorus availability. *Plant Physiol* **156**: 989-996.

Rodríguez H & Fraga R (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv* **17**: 319-339.

Ross IS (1975) Some effects of heavy metals on fungal cells. *Trans Br Micol Soc* **64**: 175-193.

Sabie FT & Gadd GM (1990) Effect of zinc on the yeast-mycelium transition of *Candida albicans* and examination of zinc uptake at different stages of growth. *Mycol Res* **94**: 952-958.

Sagoe CI, Ando T, Kouno K & Nagaoka T (1998) Relative importance of protons and solution calcium concentration in phosphate rock dissolution by organic acids. *Soil Sci Plant Nutr* **44**: 617-625.

Sayer JA & Gadd GM (2001) Binding of cobalt and zinc by organic acids and culture filtrates of *Aspergillus niger* grown in the absence or presence of insoluble cobalt or zinc phosphate. *Mycol Res* **105**: 1261-1267.

Schneider KD, Van Straaten P, De Orduña RM, Glasauer S, Trevors J, Fallow D & Smith PS (2010) Comparing phosphorus mobilization strategies using *Aspergillus niger* for the mineral dissolution of three phosphate rocks. *J Appl Microbiol* **108**: 366-374.

Silva Filho GN & Vidor C (2000) Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono *Rev Bras Ciênc Solo* **24**: 311-319.

Silva Filho GN, Narloch C & Scharf R (2002) Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina. *Pesqui Agropecu Bras* **37**: 847-854.

Simpson PG, Sale PWG & Tennakoon SB (1998) An economic analysis of the field performance of North Carolina reactive phosphate rock compared with single superphosphate for selected sites from the National Reactive Phosphate Rock Project. *Aust J Exp Agr* **37**: 1061-1076

Souza AE & Fonseca D (2009) Fosfato. (Mineral DNdP, ed.) pp. 546-568. Brasília.

Steiner F, Lana MdC, Frandoloso JF, Fey R & Zoz T (2009) Fosfato de Gafsa e fungos solubilizadores de fosfato e seus efeitos na cultura de milho. *Cult saber* **2**: 156-164.

Toledo MCMd & Pereira VP (2001) A Variabilidade de composição da apatita associada a carbonatitos. *Rev Inst Geol* 27-64.

Vassilev N, Medina A, Azcon R & Vassileva M (2007) Microbial solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes and effect of the resulting products on plant growth and P uptake. *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*, Vol. 102 (Velázquez E & Rodríguez-Barrueco C, eds.), pp. 77-84. Springer Netherlands.

Vassilev N, Mendes G, Costa M & Vassileva M (2013a) Biotechnological tools for enhancing microbial solubilization of insoluble inorganic phosphates. pp. Taylor & Francis.

Vassilev N, Martos E, Mendes G, Martos V & Vassileva M (2013b) Biochar of animal origin: a sustainable solution to the global problem of high-grade rock phosphate scarcity? *J Sci Food Agric* **93**: 1799-1804.

Vyas P & Gulati A (2009) Organic acid production *in vitro* and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*. *BMC Microbiol* **9**: 1-15.

Whitelaw MA, Harden TJ & Helyar KR (1999) Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. *Soil Biol Biochem* **31**: 655-665.

Young C, Huang Z & Lin D (2000) Studies on properties of solubilizing tricalcium phosphate of *Pseudomonas cepacia* A1-74 strain. . *J Agric Assoc China* **1**: 150-158.

**ARTICLE: SCREENING AND CHARACTERIZATION OF *Aspergillus niger*
MUTANTS EFFICIENT AT PHOSPHATE SOLUBILIZATION IN THE
PRESENCE OF FLUORIDE**

SCREENING AND CHARACTERIZATION OF *Aspergillus niger* MUTANTS EFFICIENT AT PHOSPHATE SOLUBILIZATION IN THE PRESENCE OF FLUORIDE

ABSTRACT

The use of phosphate solubilizing microorganisms is an alternative for a sustainable use of P against a backdrop of depletion of high-grade ores. Nevertheless, the chemical characteristics of rock phosphates (RP), particularly the level of toxic elements, can affect the efficiency of microbial solubilization. Fluoride (F⁻) released from fluorapatites has been shown to significantly inhibit P solubilization by *Aspergillus niger*, stimulating the search for alternatives to overcome F⁻ toxicity. Thus, the aim of this study was to select *A. niger* mutants efficient at P solubilization in the presence of F⁻. Three selected mutants were also characterized as to their P solubilization mechanisms and the solubilization potential of different P sources. Twenty-nine mutants were obtained that presented changes in their phosphate solubilization activity in comparison to the wild type (WT). The mutant FS1-331 showed higher solubilization of Araxá RP, while FS1-555 promoted higher soluble P when grown in media with calcium phosphate supplemented with F⁻ and in those with pure P sources. These mutants also showed higher tolerance to F⁻ than the WT and displayed changes in the production of organic acids. The higher production of oxalic acid by FS1-331 and FS1-555 correlated with their improved capacity of Araxá RP solubilization. A mutant with decreased P solubilization capacity showed lower production of organic acids, corroborating the importance of these compounds for RP solubilization. FS1-331 was more efficient at solubilizing Araxá, Catalão, and Patos de Minas RPs than the WT and FS1-555. The variation in P solubilization capacity of the mutants obtained in this work may help clarify the RP solubilization mechanisms by *A. niger*. Moreover, the mutants with better performance selected in this work show potential for use in microbial RP solubilization systems with P sources rich in fluoride.

Keywords: Phosphate solubilizing; *Aspergillus niger*; mutagenesis; fluoride; fluorapatite.

INTRODUCTION

Phosphate fertilizers are used intensively in agriculture for improving soil fertility. The use of lower-grade rock phosphates (RP), such as igneous RP, in a consortium with P-solubilizing microorganisms (PSM) has been shown to be an alternative for a sustainable use of P. Many studies have already reported the potential of PSM to increase the content of soluble P from RPs (Reyes et al., 2001, Vassilev et al., 2007, Farhat et al., 2009, Mendes et al., 2013b, Mendes et al., 2013a). Bacteria and fungi are able to solubilize P and are involved in the biogeochemical cycling of this element (Richardson & Simpson 2011). Among P solubilizing bacteria, those belonging to the genera *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Erwinia* and *Flavobacterium* have been commonly reported in the literature (Rodríguez & Fraga 1999). Among fungi, *Penicillium* and *Aspergillus* are the most efficient at P solubilization so far reported (Silva Filho et al., 2002, Mittal et al., 2008).

The ability of PSM to solubilize RP is mainly associated with the release of metabolites with chelating or complexing properties, such as organic acids (Mendes et al., 2013b, Vassilev et al., 2013a). The release of H⁺ during NH₄⁺ assimilation or through other metabolic processes that trigger proton excretion is also reported as a mechanism of P solubilization (Illmer & Schinner 1995). Generally, decreases in pH correlates well with increased levels of solubilized P during RP solubilization (Reyes et al., 1999a, Khan et al., 2009, Oliveira 2011, Mendes et al., 2013b).

The fungus *Aspergillus niger* is a PSM with high P solubilization activity (Mendes et al., 2013b), due to its capacity of medium acidification during growth and its production of organic acids with high metal-complexation activity. *A. niger* has been shown to solubilize either synthetic (e.g. such as Ca₃(PO₄)₂, FePO₄, AlPO₄) or natural P sources, such as RPs (Vassilev et al., 1995, Chuang et al., 2007, Mendes et al., 2013b, Xiao et al., 2013).

The chemical characteristics of RPs can interfere with the production of organic acids by PSM (Reyes et al., 2001, Schneider et al., 2010, Mendes et al., 2013a) and may bring toxic effects to microbial metabolism (Banik & Dey 1982, Mendes et al., 2013a). Recently, it has been demonstrated that fluoride (F⁻) released from fluorapatite, strongly inhibits RP solubilization mediated by *A. niger* (Mendes

et al., 2013a). Fluoride can show inhibitory effects on the fungal metabolism causing decreased growth and organic acid production. Numerous other cellular processes can be negatively affected by F^- , such as ion transport, secretion, endocytosis, cell cycle, and gene expression, and especially enzyme inhibition (Barbier et al., 2010).

Given the ubiquitous distribution of F^- in RPs, most microbial RP solubilization systems studied so far have probably been operated under suboptimal conditions (Mendes et al., 2013a) and, thus, strategies to overcome the toxic effects of F^- on phosphate solubilization must be developed. Such strategies might involve: solubilization systems in which microbial metabolites are added to RPs, with no direct microbial cultivation in the presence of the toxicity source (Goldstein et al., 1993); removal of F^- released during RP solubilization; the isolation of strains naturally tolerant to F^- from environmental samples; and mutagenesis of PSM for the production of mutants tolerant to F^- .

Mutagenesis can be done by different strategies, such as the genetic engineering for the introduction of new information into the genome or deletion of chromosomal regions, induction of random mutations with physical and chemical mutagens, and manipulation of the sexual and parasexual cycles (Nevalainen 2001). The ultraviolet light (UV) is largely used for the improvement of fungi (Hao et al., 2006, Lotfy et al., 2007, Maresma et al., 2010). The irradiation of the DNA with UV light induces the formation of lesions on DNA. The most common damage are the formation of cyclobutane pyrimidine dimers and the pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts (Pfeifer et al., 2005). Mutants of PSM with high P solubilization ability were obtained using UV light (Reyes et al., 1999b, Achal et al., 2007). For example, a mutant of *Penicillium rugulosum* showing higher solubilization of hydroxyapatite and $FePO_4$ than wild type (WT) was obtained by Reyes et al (1999b). This mutant also demonstrated high ability to solubilization of different RPs (Reyes et al., 1999a, Reyes et al., 2001). *Aspergillus tubingensis* mutants obtained by UV also showed increases in P solubilization (Achal et al., 2007). The use of UV-induced mutagenesis can allow obtaining mutant strains effective at solubilizing RPs rich in F^- .

Thus, the objective of this work was to select *A. niger* mutants with altered P solubilization capacity, in the presence of F^- , and to characterize their phosphate solubilizing mechanisms and potential to solubilize different P sources.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism and cultivation conditions

The isolate *Aspergillus niger* FS1 was obtained from the Collection of Phosphate Solubilizing Fungi, Microbiology Department, Institute of Biotechnology Applied to Agriculture (BIOAGRO), Federal University of Viçosa, Viçosa, MG, Brazil. Batch fermentations were performed in 125-mL flasks with 50 mL of the National Botanical Research Institute's phosphate growth medium (NBRIP) (Nautiyal 1999) (5 g $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 10 g glucose, 5 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g KCl, 0.1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 L deionized water). pH was adjusted to 7 and the P source was modified as stated below. *A. niger* inoculum was added to flasks at the concentration of 10^6 conidia from a suspension prepared in 0.1% (v/v) Tween 80. The flasks were incubated for 60 hours at 32 °C and 160 rpm on an orbital shaker (Mendes et al., 2013a). Uninoculated flasks were used as controls for the experiment.

Mutagenesis of *A. niger*

The mutants of *A. niger* were obtained by exposing the conidial suspension to ultraviolet light (UV). Ten milliliters of a suspension of 10^6 conidia per milliliter, prepared in 0.1 % (v/v) Tween 80, were irradiated during 16 minutes using a 13.8-W UV lamp (Mineralight) aiming at, approximately, 10 % survival. After UV irradiation the conidia were spread onto potato dextrose agar (PDA) and incubated at 28 °C for 48 hours.

Screening of mutants for P solubilization in the presence of fluoride

The *A. niger* colonies obtained on PDA were then screened on solid NBRIP medium supplemented with sodium fluoride (NBRIP-F) ($50 \text{ mg L}^{-1} \text{ F}^-$). This concentration corresponds to the maximal F^- amount that would be released when 3 g L^{-1} of Araxá RP is added to the medium (Mendes et al., 2013a). The Petri plates were incubated at $28 \text{ }^\circ\text{C}$ for four days.

The colonies having clear solubilization halos were transferred in triplicate to Petri dishes with NBRIP-F medium and incubated for six days at $28 \text{ }^\circ\text{C}$. The diameters of the P solubilization halos of the mutants and of the wild type (WT) were measured and compared by Scott Knott test at 5% probability. Monosporic purification, successive cultivation on PDA and on NBRIP-F media was performed to ensure mitotic stability (Reyes et al., 1999b) of the *A. niger* mutants.

The P-solubilization ability was confirmed through quantification of solubilized P (Mendes et al., 2013b) in liquid medium. Batch fermentations were done in liquid NBRIP-F medium and NBRIP medium supplemented with 3 g L^{-1} of Araxá RP (NBRIP-RP) (Table1). Inoculum preparation and cultivation conditions were performed as described above.

Characterization of *A. niger* mutants

Mutants showing higher or lower P-solubilizing ability than the wild type were selected for further studies. The mutants were cultivated in NBRIP medium supplemented with K_2HPO_4 as the only P source, with and without F^- , to allow the evaluation of the mutagenesis effects on organic acid release and fungal growth. The experiments were conducted in triplicate following a completely randomized design.

The influence of mutagenesis on P solubilization in the presence of F^- was also investigated. The selected mutants were grown in NBRIP-RP, NBRIP-F and NBRIP. The experiments were done in triplicate in a completely randomized design. At the end of incubation solubilized P, dry biomass, pH, titratable acidity, and concentration of organic acids were analyzed (See analytical methods below).

Effect of fluoride on RP solubilization by *A. niger* mutants

The mutants and the wild type strain were grown on NBRIP-RP medium supplemented with increasing concentrations of F^- , ranging from 0 to 50 mg L^{-1} in intervals of 5 mg L^{-1} . At the end of the experiment, solubilized P, fungal biomass, $Y_{P/B}$ (P/biomass yield = Solubilized P (mg)/dry biomass (g), in 50 mL of medium), and pH were quantified. Treatments were arranged in a completely randomized design with three replications at the central point. The results were submitted to regression analyses.

P-solubilizing performance of *A. niger* mutants with different P sources

The mutants with the highest P-solubilizing activity were also tested as to their ability to solubilize other P sources besides Araxá RP. Pure P sources, namely $AlPO_4$ and $FePO_4$, were added to NBRIP medium at an equivalent concentration of 1 g L^{-1} of P. The RPs evaluated were Catalão, Patos de Minas, Itafós, and Crandallite ore (aluminum phosphate). Due to the high variability in the P content, all the P-bearing rocks were added at 3 g L^{-1} . The experiments were conducted in a completely randomized design with three replications.

Analytical methods

After incubation, the supernatants were centrifuged at 5,000 g for 20 minutes and filtered through quantitative filter paper with 8- μ m pores (J. Prolab 42). Solubilized P, pH, titratable acidity, and organic acids were determined as described below.

Solubilized P concentration was quantified by the ascorbic acid method (Braga & Defelipo 1974). Titratable acidity was measured by titrating 5 mL of the culture filtrate to pH 7 with 0.1 M NaOH using bromothymol blue as a pH indicator. The fungal biomass retained on the filter paper was collected, dried at 70°C to a constant weight, and incinerated at 500°C for 8 h. This method avoids the

overestimation by the adherence of phosphate particles on the mycelium (Reyes et al., 1999b). Biomass yield was determined by subtracting the weight of the residue left after incineration from the weight of dried fungal mycelium.

Based on previous results for the isolate *A. niger* FS1, organic acids analysis was focused on citric, gluconic, and oxalic acids (Mendes et al., 2013b). The citric and gluconic acids were determined by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC/MS/MS) using a UPLC Agilent 1290 Series coupled to a 6400 Triple Quadrupole mass spectrometer. Chromatographic separations were carried out using an Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 column (1.8 μm , 2.1 mm x 50 mm). The column temperature was controlled at 35 °C. An isocratic flow of 97 % water and 3% acetonitrile at a flow rate of 0.45 mL/min was used. The sample injection volume was 10 or 20 μL according to the acid concentration in each sample. Eluate from UPLC was introduced into MS with APCI as ion source in negative mode. The acids were identified in an analysis time of 1.5 min using unique multiple reaction monitoring (MRM). The transitions 191.18 to 110.90 and 195.15 to 128.93 were monitored to citric and gluconic acids, respectively, according to standards (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO). For oxalic acid analyses, the culture supernatants were acidified with HCl to pH 0.5 before filtration (Mendes et al., 2013b). The compound was determined using an Ultimate Dionex 3000 High Performance Liquid Chromatogram (HPLC) equipped with RI (Index of refraction) detector and Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%) column (8 μm , 300 mm \times 7.8 mm). The mobile phase corresponded to 5 mM sulfuric acid with a flow rate of 0.7 mL/min, sample injection volume, 20 μL , and analysis time, 15 min. Oxalic acid was quantified by reference to the peak areas obtained with appropriate standards (Merck, Germany).

Statistical analyses

The data obtained were subjected to variance analysis. Comparisons between the means for each mutant and that of the wild type were done using the Dunnett test ($P < 0.05$). Multiple mean comparisons were performed using the Tukey's test ($P < 0.05$).

RESULTS

Mutagenesis of *A. niger*

After exposure to UV light, 29 mutants showing higher and lower solubilization halos than the WT in NBRIP-F medium were obtained. These mutants were quantitatively evaluated in liquid medium for solubilization of Araxá RP and $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ supplemented with F^- (Table 1). Based on these data, three mutants were selected for further studies according to the following criteria: FS1-555 showed the highest increase in P solubilization from $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ with F^- (67 %); FS1-331 showed the highest increase in P solubilization from Araxá RP (64 %) and FS1-375 decreased solubilized P for both sources. The mutants FS1-55 and FS1-42 also showed reduced ability to solubilize P, but were not chosen for further analyses because they also showed substantial growth reduction.

Characterization of *A. niger* mutants

Mutagenesis and F^- altered the organic acid profile of the strains (Fig. 1a, b). In the NBRIP- K_2HPO_4 medium, only the mutants FS1-331 and FS1-555 produced oxalic acid (Fig. 1a). The citric and gluconic acids were produced by all strains under these conditions. The production of citric and oxalic acids was inhibited in the NBRIP- $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-F}^-$ medium (Fig. 1b). All mutants showed higher growth in the NBRIP- $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-F}^-$ medium compared to the WT (Fig. 1c), but the WT grew better than the mutants in the NBRIP- K_2HPO_4 medium.

FS1-331 showed the highest value of solubilized P from Araxá RP, solubilizing 70% more than the WT (Table 3). The FS1-555 also increased the solubilization of the Araxá RP by 15% compared to the WT (Table 3). The production of acids differed among the mutants. The titratable acidity was higher in the treatments inoculated with the mutants FS1-331 and FS1-555 (Table 3). These two mutants were the only ones that produced oxalic acid in the presence of Araxá

RP (Table 4). The mutant FS1-331 increased the production of oxalic acid by 25% in comparison to FS1-555. All the mutants produced less citric acid than the WT, while the production of gluconic acid was similar for all strains (Table 4).

In the medium with $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{F}^-$, the mutant FS1-555 was the most effective at P solubilization (Table 3), showing the highest content of soluble P in the medium. Moreover, in the media inoculated with this mutant, the lowest pH value was observed. Oxalic acid was not detected under these cultivation conditions. The production of gluconic and citric acids was recorded in the medium cultivated with FS1-555 and FS1-331, respectively (Table 4).

In the medium supplemented only with $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, no difference was observed between the values of solubilized P by the mutants FS1-331 and FS1-555 and the WT (Table 3). Under these cultivation conditions, only the WT produced oxalic acid (Table 3). A significant decrease in P-solubilization was observed for the FS1-375 in the three media evaluated (Table 3). This result was accompanied by higher pH values (Table 3) and a lower production of organic acids (Fig.2). The biomass of FS1-375 was also lower than that of WT in all sources tested.

Effect of fluoride on RP solubilization by *A. niger* mutants

The selected positive mutants for Araxá RP solubilization (FS1-331 and FS1-555) were grown in media containing increasing F^- concentrations to simulate the complete release of F^- from Araxá RP and its effect on P solubilization by the mutants compared to the WT. FS1-331 showed high capacity of P solubilization at low F^- doses, solubilizing up to 90% more P than the WT (Fig. 3a). FS1-555 was the most efficient P solubilizer at higher F^- doses. In general, biomass production of the mutants was lower than that of the WT (Fig. 3b). The biomass production of FS1-331 was less affected by increasing F^- dose (Fig. 3b) and its $Y_{\text{P/B}}$ was reduced at higher F^- doses (Fig. 3c).

Higher pH values were observed in response to increasing F^- doses in the growth medium inoculated with FS1-331. For FS1-555, the $Y_{\text{P/B}}$ was not affected, but the $Y_{\text{P/B}}$ was higher than that of the WT for all doses evaluated (data not shown).

P-solubilizing performance of *A. niger* mutants with different P sources

FS1-555 presented the highest values of solubilized P and $Y_{P/B}$ for the pure P sources, namely $AlPO_4$ and $FePO_4$ (Fig. 4). When compared to the WT, this mutant increased the concentration of solubilized P from $AlPO_4$ and $FePO_4$ by 65 and 270%, respectively. In media with the RPs sources, FS1-331 showed the highest P-solubilizing ability, increasing the solubilization of Catalão RP by 55% and that of Patos de Minas RP by 180% in comparison to the WT. This mutant also showed the highest values of $Y_{P/B}$. However, none of the mutants was more efficient than the WT in the solubilization of Itafós RP. Additionally, no P was solubilized from the Crandallite ore by any of the strains.

DISCUSSION

Mutagenesis using UV light allowed selecting strains with increased P-solubilizing ability in the presence of F^- . The most prominent phenotypic difference between the mutants and the WT was the profile of organic acids produced (Fig. 1, 2). Organic acids are effective agents in mobilizing P from RPs or soil particles due to their capacity to form chelates with the cations linked to P in poorly soluble forms (Bolan et al., 1994, Kpombekou-A & Tabatabai 1994). However, the type of organic acids produced in a microbial solubilization system is of great importance, given that the effectiveness of an organic acid as a chelating agent is highly dependent on the chemical structure, type and position of the carboxyl and hydroxyl groups in the molecule (Kpombekou-A & Tabatabai 1994, Jones 1998). The mutants FS1-331 and FS1-555 were the only ones that produced detectable quantities of oxalic acid in the medium with Araxá RP (Table 4). The capacity of production of this acid under such conditions is probably the characteristic that explains the superiority of these mutants over the WT at RP solubilization. The production of gluconic and citric acids by the mutants was not higher than that of the WT. Oxalic acid was reported as the most effective organic acid in releasing P from RP (Kpombekou-A & Tabatabai 1994). The chemical structure of oxalic acid ($C_2H_2O_4$) is formed by the linkage of two carboxyl groups. The proximity of these carboxyl groups increases its chelation ability (Razzaghe-Karim & Robert 1975). Additionally, oxalate has a high tendency

to precipitate with Ca^{2+} , favoring the solubilization of apatite RPs (Jones 1998). The significance of the oxalic acid for Araxá RP solubilization is also evidenced by the fact that the FS1-331, the best P solubilizer among the strains (Table 2), showed the highest secretion of this acid (Table 4). Kpombrekou-A & Tabatabai (1994) demonstrated that a small increase in oxalic acid concentration can significantly enhance RP solubilization.

The mutants FS1-331 and FS1-555 also produced oxalic acid in the medium with a soluble P source while the WT did not (Fig. 1a). This characteristic is very interesting for microbial solubilization systems based on batch culture, since the concentration of soluble P increases along the time in this cultivation system. Conversely, the synthesis of citric and oxalic acids in all treatments with soluble P supplemented with F^- was inhibited (Fig. 1b). Fluoride inhibits the glycolytic pathway and the Krebs cycle through binding to the active center of the enzymes of these pathways (Barbier et al., 2010). The enolase is inhibited by F^- (Agrawal et al., 1983) and, thus, in the medium with F^- , a decrease in the pyruvate pool, an important precursor for the synthesis of citric and oxalic acids (Magnuson & Lasure 2004), may have inhibited the production of these acids. The addition of F^- to the $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ medium had less effect on citric acid production (Table 4). This result suggests that the P content in the medium affects organic acid production by the fungus since the low P concentrations initially recorded from the poor soluble P source favored citric acid production. P-limiting condition is a crucial factor to increase citric acid production (Papagianni 2007, Vassilev et al., 2013a).

Gluconic acid was produced under all experimental conditions and presented little variation among the strains (Fig. 1, 2). In general, the presence of F^- was not inhibitory for gluconic acid production, as previously observed by (Mendes et al., 2013a). Gluconic acid has been found in various solubilization systems and contributes mainly with protons for the solubilization reaction (Lin et al., 2006, Schneider et al., 2010) (Mendes et al., 2013a). It seems that the increased production of gluconic acid in the medium with $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ supplemented with F^- (Table 4) was the reason for the lower pH and, consequently, the higher levels of solubilized P (Table 2) observed for FS1-555.

As expected, mutagenesis changed the response of the fungus to F^- . All mutants grew more than the WT in the medium with soluble P supplemented with F^-

(Fig. 1c). This data suggests that mutagenesis allowed the isolation of mutants more tolerant to F^- since the decrease in fungal growth is one of the effects of F^- (Agrawal et al., 1983, Mendes et al., 2013a) F^- has antimicrobial action and can alter numerous cellular processes, such as respiration, metabolism, ion transport, secretion, endocytosis, cell cycle, and gene expression (Marquis et al., 2003, Barbier et al., 2010). The production of citric acid during process of P solubilization was almost completely inhibited by F^- (Mendes et al., 2013a). The negative mutant M375-L showed expressive reduction of P solubilization in all sources evaluated (Table 3). This result can be due to decreased organic acid production, mainly, citrate and oxalate (Fig. 1, 2), suggesting that the metabolism of this mutant was the most sensible to F^- .

The mutants FS1-331 and FS1-555 were more effective than the WT at solubilizing Araxá RP even at increased F^- doses (Fig. 3a). However, P solubilization by FS1-331 decreased sharply with increasing F^- doses. At higher doses, this mutant solubilized less than FS1-555, indicating that the latter is more tolerant to F^- . This can be also observed in the medium with $Ca_3(PO_4)_2$ supplemented with F^- , where the FS1-555 solubilized more P than the FS1-331 and the WT (Table 2). In the case of the FS1-555 and the WT, the decreases in P solubilization can be associated to the toxic effects of F^- on fungal growth (Fig. 3b). However, above 10 mg L^{-1} of F^- , there was no further decrease in biomass production by FS1-331, while the $Y_{P/B}$ of this mutant decreased with increasing F^- doses (Fig. 3c). These data show that the biomass became less efficient at P solubilization as a result of changes brought about by F^- in metabolic processes involved in P solubilization, as observed for the pH, which was higher at higher F^- doses (Fig. 3c).

When the mutants were tested in different P sources, the following pattern was observed: FS1-331 was more effective at solubilizing the RPs (Catalão RP, Patos de Minas RP, and Itafós RP), while FS1-555 stood out in the media with pure synthetic sources ($AlPO_4$ and $FePO_4$) (Fig. 4). FS1-555 possesses important characteristics for P solubilization, such as high production of citric and oxalic acids. However, this mutant seems to be more sensitive to other elements released from RP. Finally, none of the fungal strains was able to solubilize crandallite (Fig. 5), possibly, because of its highly stable mineralogical structure (Toledo 1999).

In this work, *A. niger* mutants with improved P-solubilizing activity and higher tolerance to F⁻ were obtained using UV light-induced mutagenesis. An improved capacity of oxalic acid production was the characteristic presented by the mutants that possibly conferred the higher RP solubilization ability. Given the effectiveness of oxalic acid to solubilize apatite RPs and that most RPs are rich in F⁻, the mutants obtained, especially M331-H, represent a significant improvement and possess a high potential for application in solubilization system with fluoride-rich phosphate sources.

CONCLUSION

UV light-induced mutagenesis allowed selecting strains of *A. niger* with increased P-solubilizing capacity in the presence of F⁻. The importance of organic acids for P solubilization systems, particularly, of oxalic acid for the solubilization of Araxá RP, was clearly demonstrated. The results showed that the P solubilizing ability of the mutants is dependent on the P sources used. The mutant FS1-331 showed high ability to solubilize all RPs. The mutant FS1-555 was more efficient at P solubilization at high F⁻ concentrations and from synthetic P sources.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for financing this work and providing scholarships to the first, second and last authors. Financial support for this study was also provided by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, FAPEMIG (GAG-APQ-00712-12)". The authors are grateful to the Center for Biomolecule Analyses (NUBIOMOL-UFV), Federal University of Viçosa, Brazil, and Hilário C. Mantovani, for organic acid analyses.

REFERENCES

Achal V, Savant VV & Reddy MS (2007) Phosphate solubilization by a wild type strain and UV-induced mutants of *Aspergillus tubingensis*. *Soil Biol Biochem* **39**: 695-699.

Agrawal PK, Bhatt CS & Viswanathan L (1983) Effect of some metabolic inhibitors on citric acid production by *Aspergillus niger*. *Enzyme Microb Tech* **5**: 373-376.

Banik S & Dey BK (1982) Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing micro-organisms. *Plant Soil* **69**: 353-364.

Barbier O, Arreola-Mendoza L & Del Razo LM (2010) Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chem Biol Interact* **188**: 319-333.

Bolan NS, Naidu R, Mahimairaja S & Baskaran S (1994) Influence of low-molecular-weight organic acids on the solubilization of phosphates. *Biol Fertil Soils* **18**: 311-319.

Braga JM & Defelipo BV (1974) Determinação espectrofotométrica de fósforo em extratos de solo e material vegetal. *Rev Ceres* **21**: 73-85.

Chuang C-C, Kuo Y-L, Chao C-C & Chao W-L (2007) Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. *Biol Fertil Soils* **43**: 575-584.

Farhat BM, Bejar W, Kammoun R, Bouchaala K, Fourati A, Antoun H, Bejar S & Chouayekh H (2009) Characterization of the mineral phosphate solubilizing activity of *Serratia marcescens* CTM 50650 isolated from the phosphate mine of Gafsa. *Arch Microbiol* **191**: 815-824.

Goldstein AH, Rogers RD & Mead G (1993) Mining by microbe. *Nat Biotechnol* **11**: 1250-1254.

Hao X-C, Yu X-B & Yan Z-L (2006) Optimization of the medium for the production of cellulase by the mutant *Trichoderma reesei* WX-112 using response surface methodology. *Food Technol Biotech* **44**: 89-94.

Illmer P & Schinner F (1995) Solubilization of inorganic calcium phosphates—Solubilization mechanisms. *Soil Biol Biochem* **27**: 257-263.

Jones D (1998) Organic acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant Soil* **205**: 25-44.

- Khan AA, Jilani G, Akhtar MS, Naqvi SMS & Rasheed M (2009) Phosphorus solubilizing bacteria: Occurrence, mechanisms and their role in crop production. *J Agric Biol Sci* **1**: 48-58.
- Kpombekou-A K & Tabatabai MA (1994) Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks. *Soil Sci* **158**: 442-453.
- Lin T-F, Huang H-I, Shen F-T & Young C-C (2006) The protons of gluconic acid are the major factor responsible for the dissolution of tricalcium phosphate by *Burkholderia cepacia* CC-A174. *Bioresource Technol* **97**: 957-960.
- Lotfy WA, Ghanem KM & El-Helow ER (2007) Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: I. Mutagenesis and cost reduction studies. *Bioresource Technol* **98**: 3464-3469.
- Magnuson J & Lasure L (2004) Organic acid production by filamentous fungi. *Adv Fung Biotechnol Ind Agri Med*, (Tkacz J & Lange L, eds.), pp. 307-340.
- Maresma BG, Castillo BG, Fernández RC, Silva ESd, Maiorano AE & Rodrigues MFdA (2010) Mutagenesis of *Aspergillus oryzae* IPT-301 to improve the production of β - fructofuranosidase. *Braz J Microbiol* **41**: 186-195
- Marquis RE, Clock SA & Mota-Meira M (2003) Fluoride and organic weak acids as modulators of microbial physiology. *FEMS Microbiol Rev* **26**: 493-510.
- Mendes GO, Vassilev NB, Bonduki VHA, da Silva IR, Ribeiro JI & Costa MD (2013a) Inhibition of *Aspergillus niger* phosphate solubilization by fluoride released from rock phosphate. *Appl Environ Microbiol* **79**: 4906-4913.
- Mendes GO, Freitas ALM, Pereira OL, Silva IR, Vassilev NB & Costa MD (2013b) Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. *Ann Microbiol*.
- Mittal V, Singh O, Nayyar H, Kaur J & Tewari R (2008) Stimulatory effect of phosphate-solubilizing fungal strains (*Aspergillus awamori* and *Penicillium citrinum*) on the yield of chickpea (*Cicer arietinum* L. cv. GPF2). *Soil Biol Biochem* **40**: 718-727.
- Nautiyal CS (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* **170**: 265-270.
- Nevalainen KMH (2001) Strain improvement in filamentous fungi-an overview. *Appl Mycol Biotech*, Vol. Volume 1 (George GK & Dilip KA, eds.), pp. 289-304. Elsevier.
- Oliveira SC (2011) *Fontes de carbono e minerais na solubilização de fosfato natural não reativo por Aspergillus niger*. Universidade Federal de Viçosa.
- Papagianni M (2007) Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnol Adv* **25**: 244-263.

Pfeifer GP, You YH & Besaratinia A (2005) Mutations induced by ultraviolet light. *Mutat Res* **571**: 19-31.

Razzaghe-Karim M & Robert M (1975) Altération des micas et géochimie de l'aluminium: rôle de la configuration de la molécule organique sur l'aptitude à la complexation. *CR AcSc Paris t* **280**: 2.645-642.648

Reyes I, Bernier L, Simard RR & Antoun H (1999a) Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. *FEMS Microbiol Ecol* **28**: 281-290.

Reyes I, Baziramakenga R, Bernier L & Antoun H (2001) Solubilization of phosphate rocks and minerals by a wild-type strain and two UV-induced mutants of *Penicillium rugulosum*. *Soil Biol Biochem* **33**: 1741-1747.

Reyes I, Bernier L, Simard RR, Tanguay P & Antoun H (1999b) Characteristics of phosphate solubilization by an isolate of a tropical *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. *FEMS Microbiol Ecol* **28**: 291-295.

Richardson AE & Simpson RJ (2011) Soil microorganisms mediating phosphorus availability. *Plant Physiol* **156**: 989-996.

Rodríguez H & Fraga R (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv* **17**: 319-339.

Schneider KD, Van Straaten P, De Orduña RM, Glasauer S, Trevors J, Fallow D & Smith PS (2010) Comparing phosphorus mobilization strategies using *Aspergillus niger* for the mineral dissolution of three phosphate rocks. *J Appl Microbiol* **108**: 366-374.

Silva Filho GN, Narloch C & Scharf R (2002) Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina. *Pesqui Agropecu Bras* **37**: 847-854.

Toledo MCMd (1999) Os fosfatos aluminosos da série da crandallita - uma revisão. *Rev Inst Geol* **20**: 49-63.

Vassilev N, Medina A, Azcon R & Vassileva M (2007) Microbial solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes and effect of the resulting products on plant growth and P uptake. *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*, Vol. 102 (Velázquez E & Rodríguez-Barrueco C, eds.), pp. 77-84. Springer Netherlands.

Vassilev N, Mendes G, Costa M & Vassileva M (2013a) Biotechnological tools for enhancing microbial solubilization of insoluble inorganic phosphates. pp. Taylor & Francis.

Vassilev N, Baca MT, Vassileva M, Franco I & Azcon R (1995) Rock phosphate solubilization by *Aspergillus niger* grown on sugar-beet waste medium. *Appl Microbiol Biot* **44**: 546-549.

Xiao C, Zhang H, Fang Y & Chi R (2013) Evaluation for rock phosphate solubilization in fermentation and soil–plant system using a stress-tolerant phosphate-solubilizing *Aspergillus niger* WHAK1. *Appl Biochem Biotech* **169**: 123-133.

Table 1. Chemical composition of rock phosphates (RP).

RP	P₂O₅	Al₂O₃	CaO	F	Particle size (μm)
	%				
Araxá	32	0.56	42	1.6	< 75
Catalão	37	0.3	48	2.2	< 75
Itafós	9	10	13	0.9	< 600
Patos de Minas	31	3	41	2.6	< 75
Crandallite	12	23	3	0.1	< 300

Table 2: Percentage increase or decrease in solubilized P in media inoculated with *Apergillus niger* FS1 mutants compared to the wild type and incubated for 60 h at 32 ° C and 160 rpm. The experiments were carried out in liquid NBRIP medium supplemented with F⁻ (NBRIP-F) and NBRIP supplemented with 3 g L⁻¹ of Araxá rock phosphate (NBRIP-RP).

STRAINS	NBRIP-F	NBRIP-RP
FS1-555	67	42
FS1-408	62	50
FS1-270	48	55
FS1-326	45	-41
FS1-307	36	14
FS1-512	29	25
FS1-506	23	-15
FS1-261	21	8
FS1-440	19	51
FS1-442	16	22
FS1-347	13	-30
FS1-331	12	64
FS1-250	9	30
FS1-98	7	-13
FS1-8	6	17
FS1-22	6	-23
FS1-262	5	16
FS1-406	4	10
FS1-164	-2	-12
FS1-537	-4	61
FS1-48	-11	22
FS1-166	-15	-10
FS1-28	-15	-5
FS1-41	-15	-8
FS1-110	-25	-6
FS1-123	-33	-10
FS1-375	-48	-52
FS1-55	-56	-72
FS1-42	-71	-43

The percentage increase or decrease on solubilized P of the mutants was calculated based on the content of solubilized P, 346 mg L⁻¹ and 61 mg L⁻¹, by the WT in the media NBRIP-F and NBRIP-RP, respectively. (P (%): $\frac{mMUT - mWT}{mWT} \times 100$, m: means; MUT: mutant; WT: Wild type).

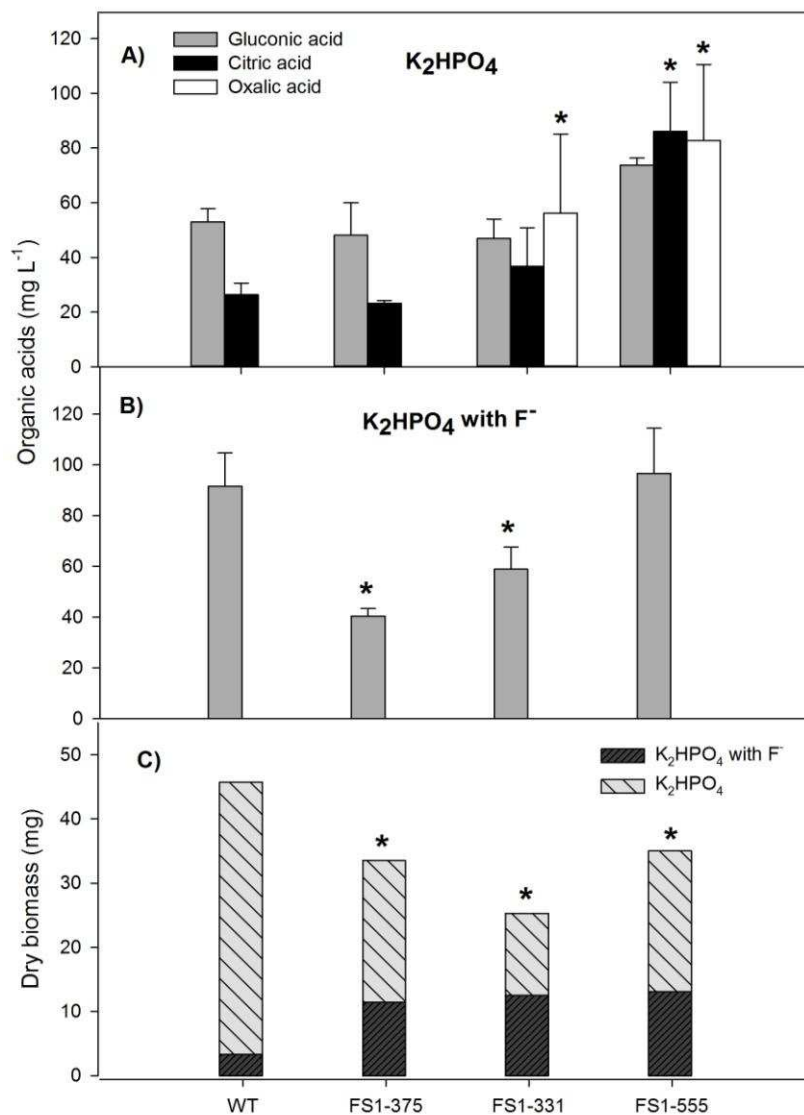


Figure 1: (A) Gluconic, citric and oxalic acid produced by *Aspegillus niger* FS1 mutants and the wild type grown on NBRIP medium with K₂HPO₄ as a P source (B) and supplemented with fluoride (0 to 50 mg L⁻¹); (C) Fungal dry biomass. The experiment was incubated for 60 h at 32 ° C and 160 rpm. * Mean is statistically different from that of the WT by the Dunnett test ($P < 0.05$).

Table 3: Solubilized P (mg L⁻¹), dry biomass (mg flask⁻¹), pH and titratable acidity (mmol H⁺ L⁻¹) in NBRIP medium supplemented with Araxá rock phosphate, Ca₃(PO₄)₂ + fluoride (50 mg L⁻¹), or Ca₃(PO₄)₂ after the cultivation of *Aspergillus niger* FS1 mutants and the wild type for 60 hours at 32 °C and 160 rpm.

Strains	Solubilized P	Dry biomass	pH	Titratable acidity
RP Araxá				
WT^a	60.70	41.63	2.91	2.5
FS1-375^b	33.32 *	34.17 *	3.27 *	0.8
FS1-331	102.75 *	26.43 *	2.79	6.4 *
FS1-555	69.66 *	28.73 *	2.77	6.0 *
Ca₃(PO₄)₂ with Fluoride				
WT	382.81	35.87	3.49	13.0
FS1-375	199.58 *	16.07 *	3.46	4.7
FS1-331	372.25	20.73 *	3.20 *	12.5
FS1-555	558.90 *	29 *	3.07 *	17.1
Ca₃(PO₄)₂				
WT	766.31	51.17	2.86	25.2
FS1-375	458.68 *	23.43 *	3.45 *	13.9
FS1-331	694.54	32.63 *	3.08	16.7
FS1-555	744.82	52.63	3.47 *	14.8

* Mean is statistically different from that of the wild type by the Dunnett test ($P < 0.05$).

^a Wild type: *Aspergillus niger* FS1.

^b Mutant with a significant reduction in phosphate solubilization potential.

Table 4: Organic acids produced by *Aspergillus niger* FS1 mutants and the wild type in NBRIP medium supplemented with (A) Araxá RP, (B) Ca₃(PO₄)₂ + fluoride (50 mg L⁻¹), or (C) Ca₃(PO₄)₂ after 60 h of incubation at 32 ° C for and 160 rpm. * Mean is statistically different from th at of the wild type by the Dunnett test ($P < 0.05$).

Strains	Gluconic acid	Citric acid	Oxalic acid
RP Araxá			
WT	286.7	163.5	nd
FS1-375	190	99.8*	nd
FS1-331	225.1	126*	27*
FS1-555	240.4	135*	22*
Ca₃(PO₄)₂ with Fluoride			
WT	1854.8	454.5	nd
FS1-375	1280.6*	103*	nd
FS1-331	1012.6*	711*	nd
FS1-555	2482.4*	249.6*	nd
Ca₃(PO₄)₂			
WT	4676.1	1114.2	nd
FS1-375	5929.7	197.3*	nd
FS1-331	7655.1*	629.3*	nd
FS1-555	6381.7*	618.4*	nd

Nd: Not detected.

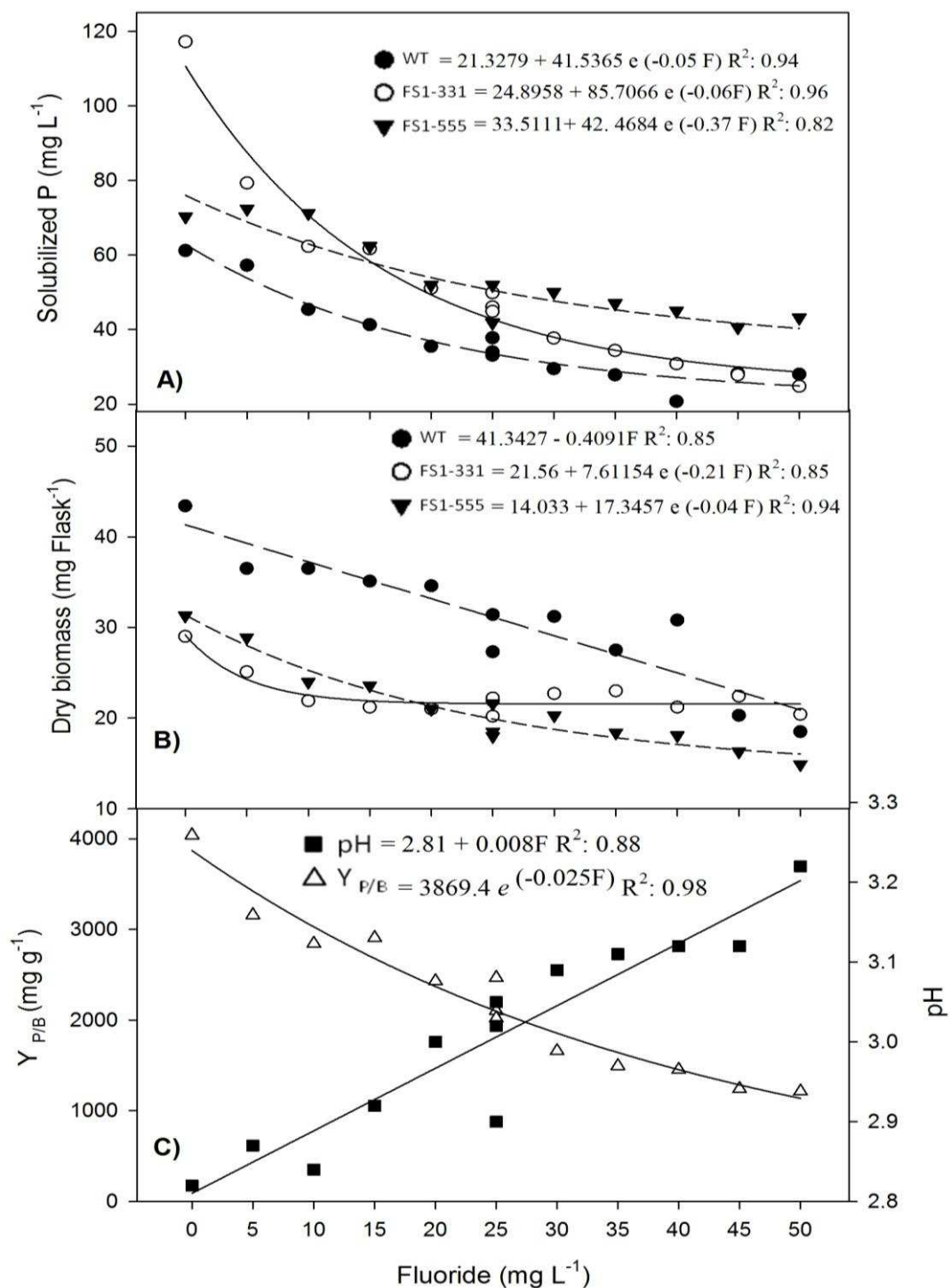


Figure 3: (A) Solubilized P and (B) dry biomass produced by the *Aspergillus niger* FS1 mutants FS1-331 and FS1-555, and the wild type, and (C) solubilization efficiency per gram of biomass ($Y_{P/B}$), and medium pH by mutant FS1-331, as a function of the fluoride dose in NBRIP medium, after 60 h of incubation at 32 ° C and 160 rpm. All regression coefficients are significant as determined by t test ($P < 0.01$).

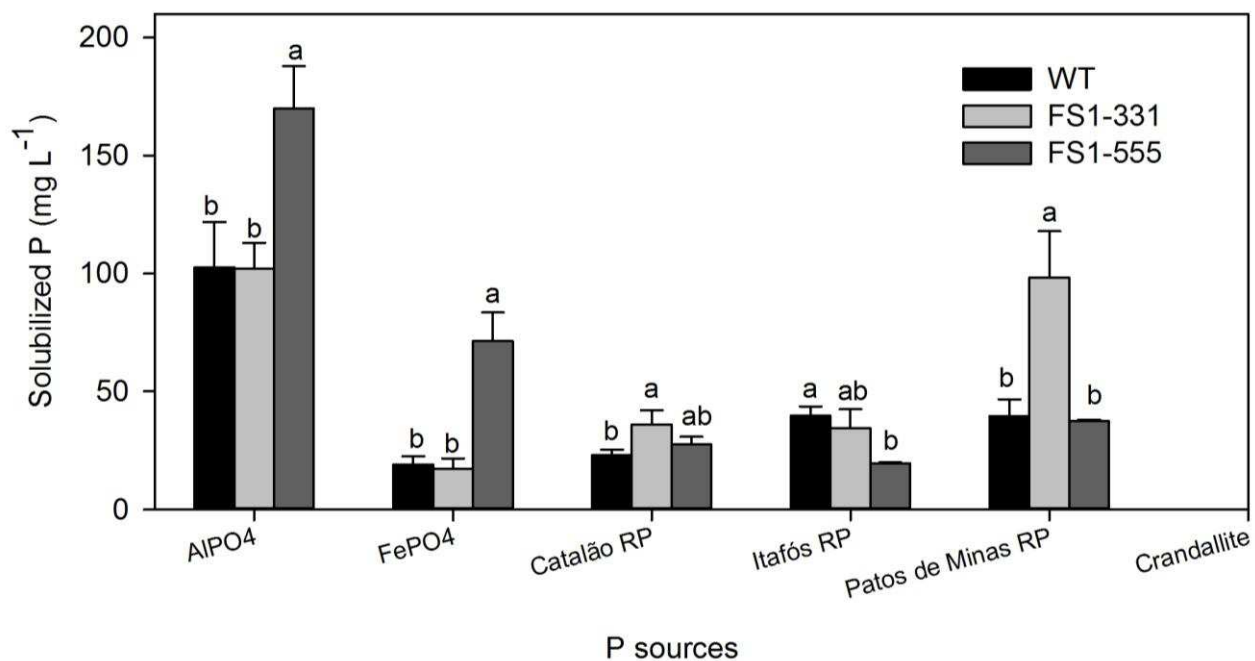


Figure 4: Solubilized P of *Aspergillus niger* FS1 mutants (FS1-331 and FS1-555) and the wild type grown in NBRIP medium supplemented with AlPO₄, FePO₄, Catalão, Itafós, or Patos de Minas RP, after 60 h. of cultivation at 32 ° C and 160 rpm. For each P source, columns with the same letter dos not differ statistically by the Tukey's test (P < 0.05).